

Chlamydia trachomatis antibody testing in screening for tubal factor subfertility : clinical application and the pathogenesis paradigm

Citation for published version (APA):

Gijsen, A. P. (2006). *Chlamydia trachomatis antibody testing in screening for tubal factor subfertility : clinical application and the pathogenesis paradigm*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20060310ag>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20060310ag](https://doi.org/10.26481/dis.20060310ag)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The present thesis focussed on the role of *Chlamydia (C.) trachomatis* antibody testing (CAT) in screening for tubal factor subfertility. CAT was developed as an inexpensive and non-invasive technique for distinguishing high-risk patients from those with a low risk for tubal factor subfertility due to silent *C. trachomatis* infection. Ideally, based on the results of CAT, high-risk patients would be subjected to diagnostic testing (i.e. laparoscopy) while additional testing of tubal patency could be postponed in low-risk patients. The clinical significance of CAT, however, has its limitations due to false negative and false positive results.

The aim of the current study was to elucidate factors that have been hypothesised as a cause of limiting the predictive value of CAT. Moreover, also factors that have been suggested to improve the predictive value of CAT were studied. To obtain more insight in *C. trachomatis* induced tubal pathology a mouse model was developed.

In **chapter 1**, the literature on the microorganism *C. trachomatis* and the way it induces infection has been reviewed. Furthermore, the pathogenesis, the immune response, and its role in the development of tubal pathology were described. Subsequently, the epidemiology, the clinical manifestations of female *C. trachomatis* genital tract infection and the need for screening programmes were discussed. An overview of the available diagnostic tests was given and screening for tubal factor subfertility was reviewed.

In **chapter 2**, it was postulated that IgG antibodies might decline over time after *C. trachomatis* infection. In view of the time span between primary *C. trachomatis* infection in adolescence and fertility work-up in adulthood, decline of *C. trachomatis* IgG antibodies over time as a potential cause of false negative CAT results was studied. A number of 39 women with an initial titre of ≥ 64 were restudied serologically after 4–7 years. The initial and a new serum sample were tested for *C. trachomatis* IgG antibodies using a micro-immunofluorescence assay (MIF). A species-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to validate the MIF test results. All patients filled out a questionnaire to determine risk factors for renewed *C. trachomatis* infection between the initial and second serum sample. Although seven of the 39 patients (18.0%) showed a significant decline in IgG antibodies by MIF over a period of 4–7 years, IgG antibodies never

became undetectable. In the 7/39 patients who showed a decline by MIF, signal/cut-off values by ELISA did not decrease. From the results of the questionnaire, it was concluded that *C. trachomatis* re-infection appeared to be no major cause of persistence of Chlamydia IgG antibody titres in the subfertile women studied. We concluded that a decline of IgG antibodies did occur, but could not be considered as a significant cause of false negative results.

In **chapter 3**, the role of *C. pneumoniae* antibodies, as a potential cause of false positive CAT results due to cross-reactivity with *C. trachomatis* antibodies in the MIF test, has been evaluated.

In 240 subfertile women serologic data were compared to laparoscopy findings. The prevalence of *C. pneumoniae* antibodies using ELISA was 75% and did not differ between patients with and without tubal pathology.

C. pneumoniae antibodies were found in 87% of women with a positive MIF test (≥ 32), and in 66% with a negative MIF test ($p < 0.0005$). Similar percentages were found when using ELISA instead of MIF for the detection of *C. trachomatis* antibodies, i.e. 87% of *C. trachomatis* positive women versus 69% of *C. trachomatis* negative women had *C. pneumoniae* antibodies ($p < 0.0005$).

Patients without tubal factor subfertility but a positive MIF test (i.e. false positive CAT result) showed *C. pneumoniae* antibodies more frequently than patients without tubal factor subfertility and a negative MIF test (true negative CAT result), indicating that *C. pneumoniae* is a major contributor of false positive CAT results by MIF. Remarkably, tubal pathology was more common in patients who had antibodies to both *C. trachomatis* and *C. pneumoniae*, supporting the contention that *C. pneumoniae* may be involved in Chlamydia upper genital tract infections and/or subsequent tubal damage.

Chapter 4 describes a comparison of five commercially available CAT tests (MIF Biomerieux, MIF Labsystems, ELISA Labsystems, pELISA Medac, ELISA Savyon) in respect of their accuracy in predicting tubal pathology was performed. In a prospectively collected cohort of 315 subfertile women results of the five CAT tests were correlated to findings at laparoscopy. Furthermore it was evaluated whether combinations of tests could improve the predictive value of CAT. Of all tests evaluated, MIF Labsystems had the single best diagnostic performance (OR 15.7), and among the three ELISA tests, pELISA Medac performed best (OR 8.2). Stepwise logistic regression analysis showed that the performance of MIF Labsystems could not be improved by adding a second test. Furthermore, except for pELISA Medac, significant cross-reactivity with *C. pneumoniae* antibodies was found in all tests.

Chapter 5 deals with screening of endocervical *C. trachomatis* infections in subfertility patients. Most of these patients will undergo uterine instrumentation as part of their fertility work-up. They are, in case of an active or dormant *C.*

trachomatis endocervical infection or colonization, considered at risk for ascending infection. Since endocervical PCR screening may not identify all dormant *C. trachomatis*, and CAT will only determine previous exposure to the organism, without providing information as to whether Chlamydia is actually present, no adequate non-invasive screening test for genital tract infection is available. Based on these theoretical arguments, we argue that prophylactic antibiotics (i.e. azithromycin in a single oral dose, 12 hours before the planned procedure) should replace endocervical screening for *C. trachomatis* and selective treatment of positive cases only.

In **chapter 6**, the development of a mouse model was described, to study the largely unknown pathogenesis of tubal factor subfertility after silent *C. trachomatis* infections. It was hypothesised that primary *C. trachomatis* infection would not result in extensive genital tract pathology, and that only subsequent *C. trachomatis* re-infection would induce tubal disease. Therefore, female C57BL/6J mice were inoculated intravaginally with human *C. trachomatis* serovar L₂. Mice were sacrificed at regular intervals, three, nine and eighteen weeks after inoculation, and the development of histopathologic changes and tissue damage in the genital tract was studied. One group of mice was submitted to re-inoculation to investigate the effect of re-infection on the development of genital tract pathology. Furthermore, to explore whether *C. pneumoniae* would contribute to the development of *C. trachomatis* induced tubal pathology, a pilot study with *C. pneumoniae* was performed. The results indicated that single intravaginal inoculation of C57BL/6J mice with the human *C. trachomatis* L₂ strain induces an infection without extensive pathology, but with a chronic inflammatory cell response. Re-inoculation stimulated the process, finally resulting in the induction of atypia of the endometrium. Changes at the tissue and cellular level were all more evident after re-inoculation. Despite our assumption that extensive pathology would be found after re-inoculation, only mild genital tract pathology and histologic changes were found. Various factors in the model that might be held responsible for the findings, e.g. the use of C57BL/6J mice and inoculation with a human *C. trachomatis* strain, were discussed.

In **chapter 7**, it was postulated that auto-immunity, based on cross-reaction of Chlamydia hsp60 (Chsp60) antibodies with human hsp60 expressed on tubal epithelial cells during persistence of infection, might be the underlying mechanism of tubal pathology. We evaluated in a mouse model whether Chsp60 and mouse hsp60 antibodies could be detected in serum following *C. trachomatis* and *C. pneumoniae* infection. The results of our pilot studies did not support the hypothesis of auto-immunity, since Chsp60 and mouse hsp60 antibody levels, even in frequently inoculated mice, were low. We recognize however the limitations of our model.

In chapter 8 topics that have contributed to our current understanding and approach of asymptomatic *C. trachomatis* infections and its late sequelae were highlighted. In this context, the results of the present studies were discussed more specifically and the most important findings were summarised.



Samenvatting

De best beschikbare standaard voor het diagnostiseren van tubapathologie ten gevolge van *Chlamydia (C.). trachomatis* infectie is de laparoscopie met tubatesten. Daar dit een invasief en duur onderzoek is, is het niet geschikt voor het screenen van groepen patiënten. Als screeningstest voor tubapathologie wordt binnen het oriënterend fertiliteitsonderzoek de Chlamydia IgG antilichaam titer (CAT) bepaling gebruikt, met als doel patiënten met een hoog risico op tubapathologie ten gevolge van *C. trachomatis* infectie te onderscheiden van die met een laag risico. Idealiter zouden patiënten at risk voor tubapathologie vroeg in het fertiliteitsonderzoek invasieve diagnostiek kunnen ondergaan (laparoscopie met tubatesten), terwijl dit in patiënten met een laag risico kan worden uitgesteld en het fertiliteitsonderzoek zich meer kan richten op andere oorzaken en behandeling van de subfertiliteit. Helaas zijn de klinische resultaten met betrekking tot het voorspellen van tubapathologie teleurstellend door het voorkomen van zowel fout-positieve als fout-negatieve CAT uitslagen.

Het huidige onderzoek richtte zich op factoren waarvan gesuggereerd wordt dat ze mogelijk verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de beperkte voorspellende waarde van CAT. Vervolgens werden mogelijkheden voor verbetering van de voorspellende waarde van CAT onderzocht. In het laatste deel van het proefschrift wordt aandacht besteed aan de ontwikkeling van een muismodel, daar een beter begrip van de pathogenese noodzakelijk is voor het ontwikkelen van een accurate screeningstest voor tubapathologie ten gevolge van asymptomatische *C. trachomatis* infecties.

Hoofdstuk 1 betreft een literatuuroverzicht over het micro-organisme *C. trachomatis* en het infectieverloop. Aan bod komen de pathogenese, de immuunrespons en de rol hiervan in de ontwikkeling van tubapathologie. Verder wordt aandacht besteed aan de epidemiologie, het klinische beeld, en de noodzaak van screeningsprogramma's. Er wordt een overzicht gegeven van de beschikbare diagnostische tests en screeningstests voor tubapathologie. De doelstellingen van het proefschrift worden uiteengezet.

Een mogelijke verklaring voor het voorkomen van fout-negatieve CAT is het dalen van titers in de tijdsperiode tussen de oorspronkelijke infectie en het fertili-

teitsonderzoek. In **hoofdstuk 2** bestudeerden we 39 patiënten met een CAT ≥ 64 ten tijde van hun fertiliteitsonderzoek. Bij hen werd 4-7 jaar later opnieuw serum afgenomen, en werd een vragenlijst afgenomen om het risico van een her-infectie in de tussenliggende periode in te schatten. CAT met behulp van een micro-immunofluorescence test (MIF) werd uitgevoerd op het initiële en het nieuwe serummonster. Ter validatie van de MIF test werd tevens een species-specifieke ELISA verricht. Zeven van de 39 (18%) patiënten toonden een significante afname van IgG antilichamen (minimaal twee titerstappen). Seroconversie van positief naar negatief werd slechts bij één patiënt aangetoond. De ELISA resultaten voor deze groep toonden geen daling van IgG antistoffen. Uit de resultaten van de vragenlijst kon worden geconcludeerd dat het voorkomen van risicofactoren voor her-infectie gelijk was voor patiënten met en patiënten zonder titerdaling. Afname van de IgG antilichaam titer lijkt derhalve geen belangrijke oorzaak voor fout-negatieve CAT uitslagen te zijn.

In **hoofdstuk 3** onderzochten we de rol van *C. pneumoniae* als potentiële oorzaak voor het voorkomen van fout-positieve CAT uitslagen. Fout-positieve CAT kunnen het gevolg zijn van kruisreactie in de MIF test tussen *C. trachomatis* en andere species, bijv. *C. pneumoniae*. In een groep van 240 patiënten werden serologische data vergeleken met de laparoscopische bevindingen. De prevalentie van *C. pneumoniae* IgG antistoffen bedroeg 75%, en was vergelijkbaar voor patiënten met en zonder tubapathologie.

Van de patiënten met een positieve MIF test (≥ 32) was 87% *C. pneumoniae* IgG positief, versus 66% van de patiënten met een negatieve MIF test ($p < 0.0005$). Wanneer de ELISA werd gebruikt voor het aantonen van *C. trachomatis* IgG waren de cijfers respectievelijk 87% van de *C. trachomatis* positieve patiënten versus 69% van de *C. trachomatis* negatieve patiënten ($p < 0.0005$). In de groep patiënten zonder tubapathologie maar een positieve MIF test ("fout-positieve" CAT) werden relatief vaker *C. pneumoniae* IgG antistoffen aangetroffen dan in de groep patiënten zonder tubapathologie en een negatieve MIF test ("terecht negatieve" CAT). Kruisreactie in de MIF tussen *C. trachomatis* en *C. pneumoniae* speelt dus een rol bij het voorkomen van fout-positieve CAT uitslagen. Opvallend was dat tubapathologie vaker voorkwam bij patiënten met zowel *C. trachomatis* IgG en *C. pneumoniae* IgG antistoffen, implicerend dat *C. pneumoniae* een rol zou kunnen spelen in het ontstaan van *C. trachomatis* gerelateerde tubapathologie.

Hoofdstuk 4 beschrijft de voorspellende waarde van CAT voor vijf commercieel beschikbare tests (MIF Biomerieux, MIF Labsystems, ELISA Labsystems, pELISA Medac, ELISA Savyon). In een prospectief verzameld cohort van 315 patiënten werden de resultaten van de vijf tests gecorreleerd aan de bevindingen bij laparoscopie. Verder werd onderzocht of een verbetering van de voorspellende waarde mogelijk was door het combineren van een of meer tests. MIF labsystems

bleek superieur aan de andere 4 tests (OR 15.7), en van de drie ELISA's, kwam pELISA van MEDAC als beste test naar voren. Logistische regressie analyse toonde geen verbetering van predictieve waarde door het combineren van twee tests. In alle tests, behalve in pELISA van MEDAC, werd een significante kruis-reactiviteit met *C. pneumoniae* antistoffen gevonden.

Hoofdstuk 5 beschrijft screening van endocervicale *C. trachomatis* infecties bij subfertiliteitspatiënten. Als onderdeel van het fertiliteitsonderzoek of -behandeling vindt frequent intra-uteriene instrumentatie plaats. De aanwezigheid van actieve danwel persisterende endocervicale *C. trachomatis* infecties vormen derhalve een risicofactor voor het ontstaan van opstijgende infecties. Endocervicale PCR screening detecteert met name actieve infectie, waardoor een persisterende infectie mogelijk niet wordt onderkend en CAT toont eerdere expositie aan *C. trachomatis*, zonder informatie over de actuele aanwezigheid van *C. trachomatis* in de endocervix. Er is geen adequate non-invasieve screeningstest voor de aanwezigheid van persisterende infectie in de tractus genitalis. Gebaseerd op deze theoretische argumenten, adviseren we profylactische antibiotica (eenmalig azythromycine, 12 uur voor de geplande ingreep) voor elke subfertiële patiënte voorafgaand aan intra-uteriene instrumentatie, in plaats van endocervicale *C. trachomatis* screening en behandeling van de patiënten met een positieve test uitslag.

In **hoofdstuk 6** beschrijven we de ontwikkeling van een muismodel, ter bestudering van het nog grotendeels onbekende ontstaan van tubapathologie ten gevolge van *C. trachomatis*. Er werd verondersteld dat uitgebreide tubapathologie niet ontstaat in aansluiting aan een primaire (subklinische) *C. trachomatis* infectie, maar dat met name herhaalde infecties kunnen leiden tot uitgesproken afwijkingen. Vrouwelijke C57BL/6J muizen werden intravaginaal geïnoculeerd met de humane *C. trachomatis* L2 stam. Intervalsgewijs werden dieren opgeofferd en de histopathologische veranderingen en weefselschade in de tractus genitalis bestudeerd. Een groep muizen onderging een tweede inoculatie om het effect van her-infectie op het ontstaan van tubapathologie te evalueren. Tevens werd een pilot-studie verricht waarin de eventuele bijdrage van *C. pneumoniae* aan *C. trachomatis*-geïnduceerde pathologie werd bestudeerd. Enkelvoudige intravaginale inoculatie van C57BL/6J muizen met humane *C. trachomatis* L2 induceerde een infectie zonder uitgebreide tubapathologie, maar met een chronische ontstekingsreactie. Re-inoculatie stimuleerde dat proces, uiteindelijk leidend tot atypie van het endometrium. Afwijkingen op weefsel- alsmede cellulair niveau waren meer uitgesproken na her-inoculatie, alhoewel uitgebreide tractus genitalis pathologie niet werd waargenomen. Diverse factoren, mogelijk verantwoordelijk voor de milde bevindingen werden bediscussieerd.

Hoofdstuk 7 vooronderstelt dat auto-immuniteit, gebaseerd op kruis-reactiviteit van Chlamydia hsp60 (Chsp60) antistoffen met humaan hsp60, ten grondslag

zou kunnen liggen aan het ontstaan van tubapathologie. In een muismodel werden in aansluiting aan infectie met *C. trachomatis* en / of *C. pneumoniae* Chsp60 en mHsp60 (mHsp60) antistoffen bepaald. De resultaten ondersteunden de hypothese niet, daar slechts sporadisch Chsp60 en mHsp60 antistoffen konden worden aangetoond.

In hoofdstuk 8 worden onderwerpen beschreven die bijdragen aan ons huidige begrip en de benadering van asymptomatische *C. trachomatis* infecties en de late gevolgen ervan. In deze context bediscussieerden we de resultaten van de gepresenteerde studies. De belangrijkste bevindingen van het onderzoek werden samengevat.